

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année Scolaire 1954-1955. — N° 19

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'AVITAMINOSE D
EXPÉRIMENTALE
CHEZ LE VEAU**

DIAGNOSTIC CHIMIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 15 Mars 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Roland DELORME

Né le 23 Novembre 1928, à OUENZA (Constantine)



LYON
BOSC Frères
Imprimeurs-Éditeurs
42, quai Gailleton, 42

1955

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AVITAMINOSE D
EXPERIMENTALE CHEZ LE VEAU
DIAGNOSTIC CHIMIQUE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année Scolaire 1954-1955. — N° 19

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AVITAMINOSE D EXPÉRIMENTALE CHEZ LE VEAU

DIAGNOSTIC CHIMIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 15 Mars 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Roland DELORME

Né le 23 Novembre 1928, à OUEZNA (Constantine)



LYON
BOSC Frères
Imprimeurs-Éditeurs
42, quai Gailleton, 42

1955

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur. M. JUNG.

Professeurs honoraires } BASSET.
DOUVILLE.
CUNY.

PROFESSEURS

Physique, Chimie et Toxicologie, Pharmacie, Hygiène du lait	MM. TAPERNOUX
Anatomie descriptive des animaux domestiques. Tératologie.	TAGAND.
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière mé- dicale.	JUNG.
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologi- que, Inspection des viandes	LUCAM.
Parasitologie et Maladies parasitaires, Zoologie appliquée, Botanique, Clinique des maladies parasitaires.	EUZEBY.
Pathologie chirurgicale, Médecine opératoire et Ferrure, Séméiologie, Clinique chirurgicale..	COLLET.
Pathologie médicale des Equidés et des Carnas- siers, Séméiologie et Propédeutique, Jurispru- dence vétérinaire, Médecine légale, Clinique médicale.	BRION.
Pathologie de la Reproduction, Séméiologie et Pathologie de la reproduction chez les animaux domestiques, Obstétrique, Clinique	BERTRAND.
Maladies microbiennes, Police sanitaire, Microbio- logie et pathologie générale, Clinique spéciale.	GORET.
Zootecnie et appréciation des animaux domes- tiques, aliments du bétail, agronomie et hygiène des animaux, économie rurale	JEAN-BLAIN.

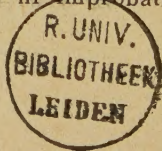
CHEFS DE TRAVAUX

MM. BARONE, FERRANDO, JOUBERT, BOST, MAGAT, Agrégés
MM. COULON, FERNEY, FLACHAT, COTTEREAU.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur MOURIQUAND.
Premier Assesseur : M. le Professeur BRION.
Deuxième Assesseur : M. le Professeur EUZÉBY.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

Qui s'est imposé tant de sacrifices
pour moi. Que ce modeste travail soit
un témoignage de mon affection et de
ma reconnaissance.

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

DE L'ECOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOURIQUAND

Président du Jury

Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon

Qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence du jury de notre thèse.

Expression de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BRION

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui nous a inspiré le sujet de notre thèse. Avec l'expression de notre vive reconnaissance pour la bienveillante attention qu'il n'a cessé de nous accorder au cours de nos études et dans l'élaboration de ce travail.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR EUZEBY

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qu'il veuille bien agréer l'hommage
de notre respectueuse reconnaissance.

INTRODUCTION

L'équilibre minéral, intervenant de façon impérative dans le métabolisme du jeune sujet, conditionne, pour une grande part, son bon état de santé et sa croissance. Il est actuellement bien connu, que cet équilibre est tributaire de la vitamine D. L'importance de ce facteur explique le rôle néfaste joué par les carences dans la production des jeunes.

Si dans certains cas il est permis de parler de carences vraies, nettement établies, il en est d'autres, par contre, où la carence est implicitement admise sans être dénoncée. Entre la parfaite santé et l'état carentiel existe une étape intermédiaire que l'on a coutume de nommer l'état de pré-carence.

Fréquent chez les jeunes animaux, son origine est le plus souvent congénitale. Ralentissant la croissance et amoindrissant l'organisme, il entraîne un état de fragilité et de prédisposition.

La nature essentiellement phospho-calcique de ce trouble, incite à rechercher un moyen expérimental pratique et sûr de diagnostic.

Déjà pratiquée chez le chien par G. Mayeux, nous avons, sur les conseils de notre Maître, le Professeur Brion, entrepris la recherche des phosphatases sériques, chez le veau, que nous avons associée à celle du taux de phosphore et de calcium, successivement, sur des sujets normaux et des sujets carencés expérimentalement.

Dans la première partie de ce travail nous rappelons succinctement la physiologie de l'os, tout en situant nos expériences.

Dans une deuxième partie nous décrivons les méthodes de dosages utilisées.

Dans une dernière partie, nous exposons les résultats des dosages et avons essayé tout en les commentant d'en tirer des conclusions.

CHAPITRE PREMIER

I. — L'OS

L'os, élément de base du squelette, constitue un des tissus de l'organisme. C'est un complexe organo-minéral. Le bon développement du tissu osseux chez le jeune conditionne son avenir économique.

1° RAPPEL DE LA STRUCTURE DE L'OS.

Du point de vue morphologique, l'os est qualifié suivant son origine de membraneux, d'enchondral, de périostique. Il est formé de cellules osseuses, les ostéoblastes, logées dans des cavités, les ostéoplastes qui se prolongent par de fins canalicules dans la substance osseuse. Cette dernière est l'osséine imprégnée de sels minéraux. La disposition de la substance osseuse est variable : en lamelles limitant des alvéoles remplies de moelle, c'est le tissu osseux spongieux ou aréolaire rencontré dans les épiphyses des os longs, les os plats, les os courts ; en couches concentriques autour des canaux de Havers qui courent selon le grand axe des os longs, c'est le tissu osseux compact ou haversien, formant la diaphyse des os longs, l'écorce des os courts et plats.

La moelle osseuse est logée dans le canal médullaire, les aréoles du tissu spongieux, les canaux de Havers. Elle présente des aspects et des rôles différents suivant les régions et les âges.

Le périoste est la couche externe et de protection des os.

Du point de vue chimique, l'os est constitué de matières minérales fixées sur un support protéique.

Les matières minérales représentent environ 70 p. cent du poids sec et se composent en majeure partie de phosphate tricalcique $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$, $2\text{H}_2\text{O}$ et de carbonate de chaux CO_3Ca .

La fraction organique de l'os comprend, en dehors des éléments médullaires, neurovasculaires et membraneux, une substance fondamentale, l'osséine, matière protéique de nature conjonctive.

2° L'OSTÉOGENÈSE.

Elle comporte un processus de construction osseuse, ossification primaire, et un de destruction suivi de réédification, ossification secondaire ou remaniement qui finit par donner à chaque os son type architectural définitif. Ce processus comporte un aspect morphologique et chimique.

A. — *L'ossification primaire.*

A ce stade, apparaissent l'os périostique et l'os enchondral. L'os périostique se forme à la face profonde du péri-chondre dont les cellules de la couche interne se transforment en ostéoblastes. Ceux-ci déposent autour de l'ébauche cartilagineuse un manchon d'osséine qui les emmure peu à peu et se calcifie.

L'os enchondral ou os spongieux a une formation différente. Les chondroplastes du centre de l'ébauche cartilagineuse s'élargissent ; ils sont éventrés par des bourgeons vasculaires issus du périoste, ménageant entre eux des travées cartilagineuses qui constituent les travées directrices de l'ossification. Les ostéoblastes placés le long de ces travées, transforment la substance conjonctive en osséine qui, en se calcifiant, s'ossifie.

Semblable processus se déroule, mais plus tardivement

au niveau de l'ébauche cartilagineuse épiphysaire. Cela contribue à l'allongement de l'os et cette croissance en longueur se poursuit tant que dure la multiplication des cellules du cartilage de conjugaison.

B. — *L'ossification secondaire.*

C'est un processus complexe de destruction ostéoclasique et de réédification osseuse ostéoblastique. Ces remaniements font disparaître l'os périostique et enchondral primitif, et aboutissent à l'édification d'une architecture osseuse nouvelle.

a) *L'ossification secondaire périostique* transforme l'os pseudo-haversien primaire en os haversien compact. Des cellules hautement spécialisées, les ostéoclastes, attaquent l'os périostique primaire et creusent de nouveaux conduits disposés selon le grand axe de l'os. A leur suite apparaissent des ostéoblastes qui déposent des lamelles osseuses concentriques et transforment ces conduits en canaux de Havers.

b) *L'ossification secondaire enchondrale* consiste dans la diaphyse en une résorption des travées ostéo-cartilagineuses et en une réédification de nouvelles travées qui se localisent aux extrémités.

Ces processus d'ostéolyse et de réédification osseuse se poursuivent pendant toute la croissance, puis ils vont en s'atténuant mais sans jamais disparaître car ils font partie du mécanisme régulateur de l'homéostasie phosphocalcique du sang.

3° ASPECT BIOCHIMIQUE DE L'OSTÉOGENÈSE.

Cet aspect de la chimiogenèse osseuse, concerne la formation de la substance préosseuse et sa calcification.

A. — *Formation du support protéique* : d'origine mésenchymateuse, on ne connaît que fort peu la transformation des protéines en substance préosseuse. D'après Levandeur

et Lacroix, il y aurait intervention d'une substance inductrice ou « ostéogénine ».

B. — Préparation du support protéique à la calcification.

Trois phénomènes caractérisent cette phase :

1) Apparition massive des phosphatases alcalines au niveau des ostéoblastes et des cellules hypertrophiques des cartilages d'ossification.

2) La matrice protéique s'enrichit en phosphore et en calcium sous forme d'ions PO_4^{---} et Ca^{++} , combinés aux protéines.

3) Elle subit rapidement des remaniements qui la rendent « calcaïfne », c'est-à-dire apte à fixer du P et du Ca sous forme de phosphoprotéinates de Ca. A ce processus participe, d'après Polonovski et Cartier, une protéinase du type catheptase.

C. — Précipitation du phosphate tricalcique : elle représente la partie essentielle de la calcification. Elle résulte d'un enrichissement local en ions PO_4^{---} et secondairement en Ca^{++} , les premiers provenant de l'action couplée de deux enzymes, dont l'un, la phosphorylase, fournit les substrats phosphoriques ; l'autre, la phosphatase, agit sur ces derniers pour en libérer les ions PO_4^{---} . Cette conception cadre avec les constatations faites dans l'os et avec l'expérimentation in vitro ; elle permet également de comprendre l'action de certaines substances tels les fluorures alcalins, qui sont des inhibiteurs des enzymes.

D. — Fixation du phosphate tricalcique aux protéines osseuses : elle se fait suivant un mécanisme encore inconnu mais qui, pour Robinson, ne serait pas phosphatase.

4° FACTEURS DE LA CHIMIOGÉNÈSE OSSEUSE.

Ils règlent l'apport, l'absorption et l'utilisation des ma-

tériaux, protéiques et minéraux, nécessaires à l'édification de l'os ; ils sont multiples, externes et internes.

Les facteurs externes :

Ils comprennent notamment le régime, les conditions d'entretien et certaines vitamines.

— *Le régime* doit pourvoir aux besoins de l'os en éléments protéiques et minéraux. Il a une importance extrême. L'approvisionnement en Ca et P pour être normal est soumis à des exigences de quantités, de proportions et de formes :

a) Les besoins minima en Ca et P varient suivant l'espèce et l'âge. La carence de ces éléments compromet la minéralisation de la substance pré-osseuse ; dans ce cas on observe un excès de tissu ostéoïde, caractéristique du rachitisme chez le jeune, de l'ostéomalacie chez l'adulte.

b) Le Ca et P doivent être fournis en proportions bien déterminées. Marek et Wellman l'expriment sous forme d'alcalinité alcalino-terreuse. Plus généralement le rapport phosphocalcique d'un aliment s'exprime par le rapport Ca/P. Sa valeur optimum moyenne, variable suivant les espèces, les races et l'âge, oscille autour de 1/1 s'il est exprimé en Ca/P et de 1/1,63 sous la forme $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$.

La nécessité de ce rapport réside dans les exigences de l'absorption du Ca qui est solidaire de celle du P. Si le rapport Ca/P est inférieur à la normale, c'est-à-dire si le Ca alimentaire est insuffisant par rapport au P, il sera complètement absorbé et l'acide phosphorique sera libéré en excès, ce qui peut engendrer de l'hyperphosphatémie avec toutes ses conséquences. Cette éventualité peut se réaliser de deux façons, soit par excès de P, hyperphosphorose, soit par insuffisance de Ca alimentaire, hypocalcémie.

Si au contraire le rapport est augmenté, c'est-à-dire si le P alimentaire est insuffisant par rapport au Ca, l'acide phosphorique est utilisé au fur et à mesure de sa libéra-

tion, mais il est épuisé avant que tout le Ca soit transformé en phosphate monocalcique absorbable. Il s'ensuivra une insuffisance d'absorption affectant surtout le P et aboutissant à de l'hypophosphatémie génératrice de rachitisme ou d'ostéomalacie suivant l'âge.

c) La forme chimique du P alimentaire n'est pas indifférente, Petersen attira l'attention sur cette notion en démontrant que chez le porc l'avoine et le maïs sont rachitigènes malgré leur haute teneur en P; mais ce P se trouve en réserve sous forme d'acide phytique et n'est libérable que par la phytase, qui n'existe qu'en faible quantité dans ces céréales.

— *La lumière solaire* joue un grand rôle en mettant les animaux dans les conditions hygiéniques optima, en transformant les stérols cutanés en vitamine D et en stimulant le métabolisme général.

— *Parmi les vitamines*, l'acide ascorbique est indispensable à la formation de la substance préosseuse.

La vitamine A est un facteur de croissance à ne pas négliger et qui doit être apporté à des doses convenables par l'alimentation.

La vitamine D favorise l'absorption et la fixation sur les os des matériaux phosphocalciques.

Les vitamines antirachitiques sont absorbées par voie buccale et par suite doivent pénétrer dans la circulation générale par la voie intestinale. Vitamine liposoluble, la vitamine D a besoin, pour être absorbée, à la fois de lipases pancréatique et intestinale, et de bile. Son action thérapeutique est nette quelle que soit la voie d'administration.

Les facteurs internes.

Ils visent plus spécialement la différenciation des matériaux nécessaires à la naissance et à la vie de l'os.

— *La phosphatase des os : biochimie normale et pathologique :*

Les phosphatases sont des enzymes libérant l'acide orthophosphorique à partir d'un substrat particulier à chaque type de phosphatase (ester, pyrophosphate, etc.) ; en général, les organes renferment en dehors des diestérases et des pyrophosphatases, un mélange de phosphomonoestérases A_1 , A_2 ou A_3 , en sorte que ces enzymes exercent simultanément leur action dans les cellules. Toutefois, les os en croissance ne contiennent pratiquement que l'enzyme A_1 .

La dénomination de phosphatase des os désigne la phosphoestérase de ce type en biochimie osseuse.

— *Caractères biochimiques* : Robinson a établi en 1923 que le squelette des mammifères en croissance contient une phosphatase, mise en évidence depuis lors dans les os et les dents de tous les vertébrés.

Cet enzyme est probablement sécrété par les ostéoblastes. Cette phosphomonoestérase A_1 hydrolyse un grand nombre d'esters naturels ou synthétiques à un pH optimum de 8,5 à 9,5. Son action sur les esters naturels dérivés des glucides présente en général un pH optimum de 9 à 9,2.

On connaît divers inhibiteurs de l'enzyme des os, en particulier les oxalates alcalins et à un degré moindre les fluorures. Les acides biliaires et surtout les corps possédant un groupement sulfhydrylé (cystéine, etc.) sont les principaux corps pouvant jouer le rôle d'inhibiteur physiologique.

La phosphatase est susceptible de présenter in situ des modifications d'intensité importantes par la mise en jeu de mécanismes encore incomplètement connus.

— *Participation de la phosphatase au mécanisme de l'ossification* :

Seuls les os en voie de formation en sont riches chez le jeune mammifère.

Le groupe de faits le plus suggestif est sans doute celui apporté par l'étude de l'évolution de l'activité phosphatase au cours de l'ossification de divers organes, étu-

diée principalement par Robinson et par Roche et ses collaborateurs.

La phosphatase est abondante dans les périodes de calcification rapide, elle disparaît quand le rythme de la minéralisation se ralentit. Un exemple caractéristique est fourni par la rotule humaine dont la calcification ne commence que dans la deuxième année de la vie ; or cet organe, d'abord dépourvu de phosphatase, en devient riche vers l'âge de deux ans, quand la première ébauche de calcification apparaît.

L'ensemble de ces faits permet d'attribuer à la phosphatase un rôle important dans les phénomènes d'ossification rapide. Mais il n'est pas sûr que l'enzyme participe aux calcifications lentes.

Après expérience de calcification in vitro des os longs, Robinson et ses collaborateurs concluent que la phosphatase est un agent de ravitaillement local en ions phosphoriques.

La phosphatase permet l'accumulation de radicaux phosphoriques dans la substance préosseuse avant la formation du phosphate tricalcique.

— *Les phosphatases sériques :*

Le sérum contient normalement deux phosphatases, l'une du type phosphomonoestérase II qui agit dans une solution à pH acide, l'autre du type phosphomonoestérase I, agissant en milieu alcalin et c'est cette dernière qui est beaucoup plus active que la précédente (Courtois et Plumel).

Les éléments figurés du sang, ont une teneur peu variable en enzyme, tandis que le plasma contient le « trop plein » de la phosphatase des divers organes, entre autres des os, du rein, de l'intestin, du foie. Une hyperproduction d'enzyme par l'un des organes qui en sont riches se traduit par une hyperphosphatasémie dont la connaissance peut être très utile aux cliniciens.

— *Variations physiologiques :* Le régime alimentaire

n'entraîne que de faibles variations: baisse au cours du jeûne et des déficiences protéiques, augmentation par ingestion de glucides en grosses quantités.

— *Variations pathologiques* : Les maladies provoquant une ostéolyse comportent en règle générale une hyperphosphatasémie.

Dans les ostéomalacies où le squelette subit une forte perte en sels, l'hyperphosphatasémie est constante (Kay).

Au cours du rachitisme, l'augmentation de la phosphatasémie est constante et apparaît d'une façon précoce.

La phosphatasémie reflète assez fidèlement le pouvoir phosphoestérasique relatif des foyers normaux ou pathologiques de production de l'enzyme.

Cependant, l'interprétation des résultats demeure délicate lorsque les modifications de la phosphatasémie sont faibles, étant donné la multiplicité des origines possibles de l'enzyme. En raison même de celles-ci, des maladies de foie, de rein, des organes hématopoïétiques provoquent une augmentation du taux sérique de la phosphatase au même titre que les maladies osseuses.

II. — LA VITAMINE D — TESTS D'AVITAMINOSE

1° LA VITAMINE D.

Bien connue depuis les observations de Huldschinsky (1919), c'est une vitamine liposoluble, encore appelée anti-rachitique. Mac Collum la sépara plus tard de la vitamine A, à laquelle elle est associée dans l'huile de foie de morue.

Les stérols, et plus particulièrement l'ergostérol fournissent par irradiation ultra-violette un produit de haute activité antirachitique. Ces travaux de Hess, Stennbock, Windaus, Rorenheim et Webster, furent repris par Reerink et Van Vijk (1929) qui purifièrent le produit obtenu. Bourdillon et Webster, en Angleterre, Windaus et Deppe, en Allemagne, travaillant dans ce sens, obtinrent un produit cristallisé, qu'ils considérèrent comme la vitamine antirachitique.

Windaus et ses collaborateurs Lettre et Schenk, partant du cholestérol découvrent, par déshydrogénation, le 7-déhydrocholestérol. Par irradiation il fournit un produit aussi actif que l'huile de foie de morue, dans le rachitisme des jeunes, qui est la vitamine D₃.

Schenk isole, par chromatographie, la vitamine antirachitique des huiles de foie de thon et de flétan : biologiquement et chimiquement, elle est semblable à la vitamine D₃ de Windaus. On peut donc conclure *que la vitamine D₃ est la vitamine anti-rachitique naturelle.*

Nous avons succinctement parlé du rôle qu'elle joue dans la chimiogenèse osseuse.

Au point de vue thérapeutique, on emploie actuellement l'huile de foie de morue ou de flétan, riches en vita-

mine D. L'emploi de cette vitamine naturelle ne va pas d'ailleurs sans inconvénients. Le Codex impose une teneur minima de 85 U.I. au g., il n'en reste pas moins que la teneur maxima est très variable avec la nourriture qu'a prise le poisson, avec la saison, avec la méthode de récolte de l'huile, etc... C'est pour toutes ces raisons qu'on tend à donner actuellement la faveur aux préparations à base de vitamine D₃ pure. L'intérêt de la vitamine D₃ est d'être très bien adaptée aux besoins des animaux. Il est incontestable que c'est elle qu'ils édifient sous l'action des rayons solaires, puisque c'est dans la peau que l'on dose la plus forte teneur en 7-déhydrocholestérol.

2° TESTS D'AVITAMINOSE D.

La carence en vitamine D comme aussi son administration se traduit dans le sang, d'une part, par des modifications du nombre d'unités par 100 cm³ de sérum et d'autre part, par des modifications de taux de calcium, de phosphore et de la phosphatase.

Les premières constituent les signes directs ; les secondes les signes indirects.

— *Les signes directs* : le dosage de la vitamine D dans le sang n'est pas réalisable de façon pratique. Warkany a mis au point un procédé de dosage qu'il a employé chez l'enfant, puis chez l'adulte en collaboration avec Guest et Grabill.

Le sérum sanguin est desséché, mis en ampoule, conservé au froid, puis essayé sur le rat rachitique (méthode du « line test »). Cette méthode a permis aux auteurs de déterminer les normales, mais elle demande beaucoup de sang, de nombreux animaux et surtout beaucoup de temps.

Une autre méthode complexe et délicate consiste à faire un dosage spectrophotométrique. Cette complexité et la précision requises, condamnent son application en série.

— *Les signes indirects* : les signes indirects sont par contre, d'une détermination plus aisée et plus rapide, mais ce qui importe c'est d'en estimer la valeur comme test d'hypo-vitaminose, tout en se rappelant constamment que ces tests ne sont plus spécifiquement liés à l'apport de vitamine D ; il s'agit de variation du calcium, de phosphore minéral libre, de la phosphatase dans le sérum.

Il y a peu de travaux comparant la signification des signes directs et indirects.

Les expériences de Warkany, Guest et Grabill révèlent une discordance importante au cours de l'ingestion de fortes doses de vitamine D et son reflet dans le sérum. Ainsi, le taux de la vitamine D dans le sérum peut ne pas constituer un test fidèle.

H. Standstedt et K. Sjoberg ont montré que lorsque l'on n'administre pas de vitamine D, le calcium et le phosphore diminuent dans le sérum des porcs lorsqu'ils sont absents de l'alimentation, mais que dans les deux cas il se produit une augmentation de phosphatases : cette augmentation est généralement très grande, tandis que la réduction de la calcémie est souvent légère.

Une diminution de la phosphorémie et une augmentation de phosphatase sont l'indice d'une carence en P.

Une calcémie normale, une phosphorémie élevée et une augmentation de phosphatase indiquent une carence en Ca.

L'analyse du sérum peut donc indiquer ces carences avant tout symptôme clinique.

III. — AVITAMINOSE D EXPERIMENTALE

Au même titre que le porc, le chien, le poussin, le rat, le veau est un animal pré-carencable. L'existence de jeunes bovidés présentant, parfois même dès leur naissance, des troubles osseux et plus particulièrement du rachitisme, suffit pour nous en convaincre.

La vitamine D pouvant être apportée à l'animal par l'alimentation, ou en se synthétisant grâce à l'action bénéfique des rayons solaires, nous en avons supprimé les sources pour réaliser nos expériences.

Nous nous sommes adressés à de jeunes veaux sevrés et en parfait état de santé que nous avons placés dans des conditions spéciales, d'habitat et d'alimentation.

— *L'habitat* : une étable assez vaste, pouvant loger sept à huit animaux, assez bien aérée. Par contre l'éclairage était à dessein insuffisant, deux petites fenêtres haut situées ne permettant pas un ensoleillement intense. La litière des animaux était constituée par de la paille de seigle.

— *L'alimentation* : nos veaux ont reçu l'aliment composé suivant :

Oligoéléments	0,12
ClNa	2,25
Bicarbonate de Na	1,5
Phosphate bicalcique	0,6
CO ³ Ca	10,53
Manioc	37
Orge	5
Maïs	5
Remoulage	15
Tourteau d'arachide	12
Tourteau de soja	6
Tourteau de coprah	3
Radicelles d'orge	2

Il convient de mentionner que pour favoriser le bon entretien des veaux, chaque individu reçut une fois par semaine, pendant les trois mois d'expérience, 100.000 U.I. de vitamine A.

Pendant deux ans, deux lots d'animaux ont été placés dans ces conditions spéciales. Une fois par semaine 20 cm³ de sang, pris à la veine jugulaire, ont été prélevés en vue d'analyse. Concurrément, du sang fut prélevé aux abattoirs, sur des veaux sains, arrivant directement de la ferme.

Nous allons donc maintenant envisager les méthodes de dosages et ultérieurement leurs résultats.

CHAPITRE II

METHODES DE DOSAGE UTILISEES

I. — Dosage du calcium.

MÉTHODE DE M. B. DREVON ET M^{lle} MANDON.

Cette méthode récemment mise au point, utilise la photométrie de la réaction Complexone-Murexide. Tout en étant très rapide, elle permet une précision au moins égale, aux micro-méthodes déjà connues.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE.

— Une microburette de 1 ou 2 cm³ graduée en centièmes.

— Plusieurs tubes à hémolyse de 5 à 7 cm³, très propres, pouvant se placer dans un colorimètre photoélectrique.

— Un colorimètre photoélectrique muni d'un écran vert filtrant les radiations de 520 m μ environ.

RÉACTIFS.

1) *La solution mère de calcium à 1 g. p. 1.000.*

Dans une fiole de 500 cm³, jaugée à + 20° C., et vérifiée, introduire sans perte 1,250 g. de CO³Ca pur et desséché. Cette solution est attaquée par de l'acide chlorhydrique en très léger excès. Lorsque la dissolution est totale, compléter au trait de jauge avec de l'eau bi-distillée à 20° C. Cette solution peut être conservée en flacon « Polythène », pendant au moins 40 jours sans perte de titre.

2) *La solution étalon de Ca^{++} à 0,01 mg. p. 100 cm^3 .*

Au moment du besoin, diluer avec soin 5 cm^3 de solution mère à 50 cm^3 .

3) *La solution titrée du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A.).*

Ce sel se trouve dans le commerce dans un état suffisant de pureté pour permettre la préparation par pesée directe à la balance de précision, d'une solution aqueuse (eau bi-distillée) 0,002 M à 0,7442 g. p. 1.000 dont 1 cc. correspond à 0,000040 g. (40 $\mu\text{g.}$) de Ca.

Une telle solution permet, en principe, un dosage direct, par lecture volumétrique. En pratique on emploie une solution à 0,002 M, qui restant stable pendant quelques semaines permet d'obtenir des résultats assez précis.

4) *Indicateur murexide.*

C'est une solution aqueuse saturée, faite extemporanément par 5 ou 10 cm^3 à la fois, et filtrée sur coton de verre serré. Son titre exact est sans importance. La solution est rejetée après l'emploi.

5) *Hydroxyde de sodium.*

C'est une lessive de soude « à l'alcool » au titre approximatif de 8 N.

6) *Eau bi-distillée* : Elle doit être fraîche, ou conservée en flacons « pyrex ».

PRINCIPES.

Cette méthode de dosage, utilisant la photométrie de la réaction Complexone-Murexide, deux principes pouvaient, à priori, être retenus.

1° Tout d'abord l'emploi de la murexide seule. La murexide, sel d'ammonium de l'acide isopurpurique, indica-

leur des ions Ca^{++} est connue depuis le travail de M. Beilstein en 1858.

2° L'emploi du sel sodique de l'acide éthylène diamine tétracétique, plus connu sous le nom de « complexone III » de Schwarzenbach, de « Trilon B », de « Versène ».

Dans le premier cas il est mis à profit le virage de la murexide, du violet à l'orangé en présence de Ca^{++} . Ses conditions d'emploi en biologie ont été précisées par Raaflaub, qui a insisté sur la nécessité d'un pH et d'une forme ionique déterminés, mais ne semble pas être parvenu, même en faisant usage d'un colorimètre photoélectrique, à rendre la méthode utilisable au dosage de la calcémie. Aux difficultés de la colorimétrie en milieu, de pH et de concentration saline bien définis, s'ajoutent celles dues à la présence constante du Mg qui interfère.

De là découle une diminution importante de la sensibilité de la réaction, inconvénient rédhibitoire lorsque l'analyse porte sur des milieux biologiques où les teneurs en Ca et les volumes des prises d'essais sont limités.

Par contre l'usage du Complexone III repose sur un principe tout différent. Le cation Ca^{++} est amené à former un anion complexe interne, « chélate », dans lequel il est complètement dissimulé à ses réactifs et en particulier à la murexide. La condition pour que se forme le complexe chélaté du Ca avec le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique, est un pH très alcalin, supérieur à 12.

La murexide est ajoutée dans la solution calcique tamponnée à $\text{pH} \geq 12$ par de la soude. Le milieu prend une teinte orangée caractéristique du Ca^{++} . Il est versé, à la burette, une solution titrée de Complexone. Dès que la totalité du calcium est « complexée », la murexide reprend sa coloration violette propre ; c'est, ici, le virage de l'orangé au violet qui sert d'indicateur de fin de réaction. L'essentiel de la méthode consiste :

— D'une part, dans l'usage systématique d'un colori-

mètre photo-électrique, pour suivre le virage de la murexide et déterminer graphiquement le point de virage.

— D'autre part, et ceci grâce à la rapidité des opérations, dans la comparaison systématique, lors de chaque série de dosages, de la réaction obtenue avec celle d'une solution titrée étalon de calcium de titre voisin.

TECHNIQUE.

Dans un tube à hémolyse, on mesure exactement, avec une pipette spéciale (vérifiée par pesée de mercure), 0,5 ou 1 cm³ de sérum. On ajoute 2 cm³ d'eau bi-distillée, 1 à 2 gouttes de murexide et 2 gouttes de lessive de soude. On prépare aussitôt un 2^e tube identique qui permettra :

a) De juger grossièrement des modifications de couleur du contenu du tube n° 1.

b) De faire ultérieurement un second dosage contrôlant le premier. La solution titrée d'E.D.T.A. est introduite par fraction de 0,1 à 0,2 cm³ au début, soit en comptant le nombre de gouttes, soit en mesurant les volumes à la burette. Lorsque le virage paraît proche, on suit au photocolorimètre, les variations de la densité optique après chaque affusion d'E.D.T.A. Après avoir mélangé les liquides (si l'on mélange « par renversement » utiliser un doigtier de caoutchouc), on peut, pour plus de rapidité porter directement sur un papier millimétré, la densité optique (divisions du tambour gradué de l'appareil) en fonction du volume ou du nombre de gouttes.

La construction graphique donne deux demi-droites, l'une descendante correspondant au virage progressif de l'indicateur, l'autre sensiblement horizontale qui correspond au palier que l'on obtient en continuant les affusions d'E.D.T.A. et les lectures photométriques, après que le virage a été obtenu. L'abscisse du point d'intersection des deux demi-droites permet de connaître (à $\pm 0,01$ cc. près) le volume exact de solution utilisé.

Toutes ces opérations, plus longues à décrire qu'à exécuter, ne demandent que quelques minutes. On fait une seconde mesure sur le contenu du tube n° 2.

Ce même mode opératoire est suivi en partant de 0,5 ou 1 cm³ de solution étalon de Ca, additionnée exactement des mêmes quantités d'eau, de soude et d'indicateur que pour le sérum précédemment analysé. Pour toutes ces opérations de comparaison, on utilise les mêmes pipettes jaugées.

Soient n_e et n_t les abscisses du point de virage de l'essai (sérum) et du témoin. La teneur en Ca^{++} du sérum est donnée, avec une approximation ± 1 p. 100 par l'expression :

$$\text{Ca}^{++} = \frac{(100 \ n_e) \ 0,98}{n_t}$$

Le coefficient 0,98 permet l'obtention d'un résultat exact, le résultat brut étant légèrement faussé du fait des protéines sériques.

II. — Dosage du phosphore minéral et des phosphatases sanguines.

MÉTHODE DE A. BODANSKY, MODIFIÉE PAR PAUL MEUNIER
ET YVES RAOUL

PRINCIPE.

Il est fondé sur le dosage parallèle du phosphore minéral du plasma sanguin avant et après l'addition d'un substrat renfermant un large excès de glycérophosphate de sodium. La différence de phosphore minéral constatée entre les deux dosages mesure l'hydrolyse effectuée par les phosphatases du sang.

MESURE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE.

Nous employons la technique de Paul Meunier en raison de sa relative simplicité et de la possibilité que nous avons d'employer un électromètre de sa conception.

— 1° On opère sur le plasma afin d'éviter les phénomènes de phosphominéralisation autonome du sang provenant de l'hydrolyse des esters phosphoriques des globules.

— 2° On fait agir la phosphatase du plasma qui serait surtout une phosphatase β sur le β -glycérophosphate de sodium et dans les conditions optima d'action, c'est-à-dire pH : 8,5 à 38° ainsi qu'il est réalisé dans la technique de Bodansky à l'aide d'un tampon de diéthylbarbiturate sodique.

— 3° On se contente d'un temps d'action de 1 heure dans une étuve à thermostat, de manière à éviter une disproportion trop grande et préjudiciable au dosage entre les quantités de P minéral préexistant et néoformé.

Ainsi, même dans le cas de très grande activité phosphatasique, l'enzyme se trouve toujours en présence d'un grand excès de substrat. Les conditions d'action se trouvent ainsi aussi identiques que possible d'un sang à l'autre.

— 4° L'unité adoptée est celle proposée par Bodansky, la plus répandue actuellement ; elle s'exprime par le nombre de milligrammes de phosphore libérés par 100 cm³ de plasma agissant pendant 1 heure à 38° sur un substrat renfermant un large excès de β -glycérophosphate de sodium à pH 8,6.

DOSAGE DU PHOSPHORE MINÉRAL.

La méthode la plus sensible, en vue d'un sub-microdosage, est celle qui mesure l'intensité de la coloration bleue du complexe phospho-molybdique réduit. On emploie les réducteurs du type photographique qui permettent la préparation de réactifs de conservation assez lon-

gue. Dans les conditions du dosage et aux doses de phosphore rencontrées l'intensité des colorations suit parfaitement la loi de Beer.

SUB-MICRODOSAGE DES PHOSPHATASES DU PLASMA

— Réactifs :

1° Substrat de Bodansky.

Glycérophosphate de sodium	2,5 g.
Diéthylbarbiturate de sodium	2,12 g.
Eau bidistillée q.s.p.	100 cm ³

2° Solution de NaCl à 1,8 p. 100.

3° Acide trichloracétique à 25 p. 100.

4° Réactif A :

Molybdate d'ammonium	2,5 g.
Acide sulfurique (5 N)	100 cm ³

5° Réactif B :

Sulfate de monométhylparamidophénol ...	0,5 g.
So ³ NaH à 15 p. 100	195 cm ³
So ³ Na ² à 20 p. 100	5 cm ³

Toutes les solutions sont faites dans l'eau bi-distillée.

— Mode opératoire :

Dans une fiole jaugée de 5 cm³ on mélange :

Fiole T :

Substrat réchauffé	1 cm ³
NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Eau bi-distillée	0,1 cm ³
CCl ³ COOH à 25 p. 100	0,2 cm ³

Dans deux tubes à centrifuger on verse :

Tube n° 1 :

NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Plasma	0,1 cm ³

Tube n° 2 :

Substrat réchauffé à 38°	1 cm ³
NaCl à 1,8 p. 100	0,1 cm ³
Plasma	0,1 cm ³

On porte le tube n° 2 pendant 1 heure à l'étuve à 38°. A la sortie de l'étuve, le tube est plongé dans l'eau glacée, qui arrête l'action des phosphatases.

On ajoute dans le tube n° 1 : 1 cm³ de substrat, puis dans les tubes 1 et 2 : 0,2 cm³ d'acide trichloracétique. Ensuite on centrifuge.

On décante dans des fioles jaugées de 5 cm³ et au culot est ajouté 0,1 cm³ d'acide trichloracétique à 25 p. 100. Après mélange et nouvelle centrifugation on décante dans les fioles de 5 cm³ correspondantes.

On ajoute enfin dans les fioles T, 1 et 2 :

Solution A	1,5 cm ³
Solution B	1,5 cm ³
Eau bi-distillée q.s.p.	5 cm ³

On agite et laisse reposer une demi-heure à la température du laboratoire avant de faire la lecture à l'électrophotomètre. (Nous avons employé la cuve de 10 mm. et un diaphragme réglé à 9 avec une longueur d'onde correspondant au rouge.)

— Calcul :

Soient n, N et N' les chiffres lus sur le tambour de l'électrophotomètre pour les fioles T, 1 et 2 :

$$P \text{ minéral dans } 1 \text{ cm}^3 = (N - n) \times m.$$

P libéré par les phosphatases en unité Bodansky :

$$(N' - N) \times m/10.$$

n représente l'absorption due à la cuve remplie avant l'apparition de la coloration bleue.

m est la variation de concentration correspondant à

une division du tambour. Elle s'exprime en milligramme ou en dixième de mg. par cm^3 par exemple. Le calcul de m s'effectue une fois pour toutes pour une cuve, un écran donné et pour les réactifs que l'on vient de préparer : c'est la moyenne de 4 à 5 déterminations faites sur des concentrations différentes et connues. Il faut pour cela une solution étalon contenant 0,4 mg. de P par 5 cm^3 (80 mg. par litre).

— *Préparation de la solution étalon :*

On fait dissoudre 0,3509 g. de phosphate monopotassique pur dans l'eau bi-distillée, et on verse dans un flacon gradué à 1 litre ; on ajoute 10 cm^3 de SO_4H_2 10 N, et on complète à 1 litre avec de l'eau bi-distillée.

$0,1 \text{ cm}^3$ de cette solution contient 0,008 mg./l. de phosphore.

On prépare deux autres solutions en mettant :

— 30 cm^3 de solution étalon dans 70 cm^3 d'eau ; $0,1 \text{ cm}^3$ de cette solution contient 0,0024 mg. de P ;

— 80 cm^3 de solution étalon dans 20 cm^3 d'eau ; $0,1 \text{ cm}^3$ de cette solution contient 0,0064 mg. de P.

Mais les réactifs A et B ne sont pas très stables. Il se produit vite une réduction de l'intensité de la coloration du complexe phosphomolybdique et ceci, pour une même dose de phosphore. Aussi, le facteur m dépendant de l'étalonnage, doit être souvent recalculé.

Pour pallier cet inconvénient, les réactifs A et B sont remplacés par ceux, employés dans la méthode de Briggs, sans influence sur les résultats puisque seules les conditions d'hydrolyse sont significatives.

— Réactif molybdique :

On dissout 25 g. de molybdate d'ammonium dans 300 cm^3 d'eau bi-distillée.

On ajoute à la solution :

SO^4H^2 concentré : 75 cm^3 ;

eau bi-distillée : 125 cm^3 .

— Solution aqueuse d'hydroquinone à 1 p. 100, plus
1 goutte de SO^4H^2 concentré pour éviter l'oxydation.

— Solution aqueuse de sulfite de sodium à 20 p. 100.

Après centrifugation et décantation dans les fioles T,
1 et 2, on ajoute de ces 3 trois solutions :

Solution molybdique	1 cm^3
Solution d'hydroquinone	1 cm^3
Solution de sulfite de Na	1 cm^3
Eau bi-distillée q.s.p.	5 cm^3

La lecture est faite 30 minutes après, comme dans la
méthode précédente.

CHAPITRE III

RESULTATS DES DOSAGES

Dans toutes les espèces prises dans des conditions de santé satisfaisantes, les taux de Ca et P sont constants. Le problème des phosphatases par contre, est plus complexe et à nos jours, aucune donnée certaine n'a encore été avancée.

Pour le calcium, chez le veau, Liegeois et Derivaux citent des taux allant de 100 à 120 mg. par litre avec une moyenne de 114 mg./l.

Pour le phosphore minéral, ces mêmes auteurs citent des taux allant de 58 à 85 mg. par litre, avec une moyenne de 67 mg./l.

Aucun auteur ne donne le taux des phosphatases chez le veau en unité Bodansky (U.B.).

Envisageons, après ces considérations, les résultats de nos dosages.

A. — OBSERVATIONS FAITES SUR DES VEAUX SAINS PRIS AU SEVRAGE.

Avant d'entreprendre des dosages de phosphatasémie sur des veaux pré-carencés en vitamine D, nous avons tenu à en préciser le taux, chez des veaux ayant toutes les apparences de la bonne santé.

TABLEAU I. — 11-5-1953.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	73	123	6,7
N° 2	78	125	10
N° 3	64	110	10
N° 4	57	108	4,5
N° 5	66	108	6,6
N° 6	52	128	9,2

TABLEAU II. — 13-6-1953.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	76	120	4,2
N° 2	63	122	7,1
N° 3	60	128	4,3
N° 4	67	125	5,6
N° 5	64	105	9,4
N° 6	73	118	8,8
N° 7	60	113	10,9
N° 8	71	108	5,7

TABLEAU III. — 22-6-1953.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	74	113	12,6
N° 2	71	108	8,4
N° 3	62	105	6,6
N° 4	71	110	6,9
N° 5	66	113	9,1
N° 6	63	108	19,9
N° 7	66	108	10,4
N° 8	80	118	15,4

TABLEAU IV. — 26-6-1953.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	62	110	5,9
N° 2	62	118	6,4
N° 3	50	103	4,8
N° 4	57	120	7,4
N° 5	69	118	13
N° 6	77	115	6,6
N° 7	66	123	9,1
N° 8	63	118	4,3

TABLEAU V. — 12-3-1954.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	66	116	5,7
N° 2	52	111	3,2
N° 3	66	115	10,6
N° 4	70	111	5,6
N° 5	67	109	4,1
N° 6	60	109	4,3
N° 7	63	111	5,6
N° 8	66	115	3,6
N° 9	75	119	2
N° 10	70	113	4,5
N° 11	59	110	4,9
N° 12	77	116	1,4
N° 13	53	111	10
N° 14	66	120	5,5
N° 15	67	118	4,8
N° 16	62	110	4,1

TABLEAU VI. — 2-6-1954.

Veaux sains	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	33	110,5	4,6
N° 2	62	111	2,4
N° 3	56	107	2,7
N° 4	70	105	2,1
N° 5	62	109,5	5
N° 6	63	109	2,9
N° 7	50	113,5	2,7
N° 8	70	105	3,8
N° 9	63	102,5	3,1
N° 10	60	101	3,2
N° 11	64	105	7,7
N° 12	59	116	3,5
N° 13	64	109	9,7
N° 14	64	105	3,5
N° 15	74	112,5	5,6
N° 16	55	113	3,1

Nos dosages personnels nous donnent les moyennes suivantes chez le veau sain :

Phosphore : 64,4 mg./l. (50 mg./l. — 72 mg./l.).

Calcium : 112,8 mg./l. (105 mg./l. — 118 mg./l.).

Ces chiffres sont en accord avec ceux enregistrés par Liegeois et Derivaux.

Pour les phosphatases nous trouvons une variation de taux allant de 4 à 11,6 Unités Bodansky.

B. — OBSERVATIONS FAITES SUR DES VEAUX CARENCÉS DÈS LE SEVRAGE.

Après avoir entrepris le dosage de la phosphatasémie chez l'animal sain, nous avons cherché à en déterminer le taux, chez l'animal carencé expérimentalement.

TABLEAU VII. — 27-2-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	69	102	10,2
N° 2	87	105	7,3
N° 3	64,5	107	1,6
N° 4	67,5	108	3,6
N° 5	76,5	102	9
N° 6	87	138	5,1

TABLEAU VIII. — 10-3-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	79	105	7,3
N° 2	89	100	4,35
N° 3	87	103	2,5
N° 4	85	108	3,1
N° 5	77	113	4,5
N° 6	62	105	3,5

TABLEAU IX. — 17-3-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	73	108	1,7
N° 2	77	113	1,5
N° 3	80	108	2
N° 4	71	108	1,8
N° 5	70	118	3,5
N° 6	63	113	3

TABLEAU X. — 24-3-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	78	108	1,5
N° 2	102	105	1
N° 3	87	98	0,6
N° 4	73	98	0,8
N° 5	80	105	1,4
N° 6	66	135	1,8

TABLEAU XI. — 31-3-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	78	108	0,7
N° 2	78	98	1,5
N° 3	74	110	1,4
N° 4	57	105	2
N° 5	60	118	1,4
N° 6	67	103	1,1

TABLEAU XII. — 7-4-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	78	109	0,8
N° 2	96	118	1,1
N° 3	62	103	2,2
N° 4	71	102	0,8
N° 5	73	101	1
N° 6	69	103	1,8

TABLEAU XIII. — 14-4-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	67	98	1,8
N° 2	74	118	2
N° 3	76	103	1,4
N° 4	63	98	0,7
N° 5	76	105	2,1
N° 6	74	125	1,8

TABLEAU XIV. — 21-4-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	67	108	1,8
N° 2	96	110	0,6
N° 3	81	105	1,1
N° 4	73	93	1,4
N° 5	74	98	2,2
N° 6	85	108	1,8

TABLEAU XV. — 28-4-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	77	103	0,5
N° 2	87	98	0,8
N° 3	77	103	1,8
N° 4	81	100	0,8
N° 5	83	95	2
N° 6	mort		

TABLEAU XVI. — 5-5-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	81	105	2,5
N° 2	88	98	1,2
N° 3	89	100	3,6
N° 4	88	98	1,4
N° 5	85	103	2,6

TABLEAU XVII. — 12-5-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	70	100	2,8
N° 2	69	98	1,5
N° 3	63	103	2,5
N° 4	67	98	1,5
N° 5	71	118	1,5

TABLEAU XVIII. — 19-5-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	67	98	2,4
N° 2	82	95	1
N° 3	81	100	2,4
N° 4	81	98	2,2
N° 5	71	98	2,2

TABLEAU XIX. — 19-1-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	51	118	0,9
N° 2	54	118	2,55
N° 3	72	120	0,60
N° 4	46,5	115	3,30
N° 5	57	113	1,5
N° 6	63	109	2,4

TABLEAU XX. — 27-1-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	67	107	7,35
N° 2	69,5	115	7,65
N° 3	65	103	4,5
N° 4	61,5	108	13,25
N° 5	65	98	6,15
N° 6	61,5	100	8,40

TABLEAU XXI. — 3-2-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	43	104	2,7
N° 2	57	106	3,5
N° 3	61	100	5,2
N° 4	67	104	4,5
N° 5	57	99	3,6
N° 6	49	100	5,5

TABLEAU XXII. — 10-2-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	43	115	3
N° 2	52	115	2,7
N° 3	54	102	2,4
N° 4	51	122	3,5
N° 5	49	102	1,4
N° 6	52	100	2,7

TABLEAU XXIII. — 17-2-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	61	108	0,6
N° 2	61	108	4,2
N° 3	63	101	3,4
N° 4	55	104	4,3
N° 5	66	100	4,1
N° 6	61	100	2,9

TABLEAU XXIV. — 24-2-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	52	109	3,6
N° 2	64	104	4
N° 3	56	103	4,5
N° 4	62	108	4,2
N° 5	73	103	3,6
N° 6	59	97	4,2

Après cette série de dosages, nos résultats moyens furent les suivants :

Phosphore : 70,75 mg./l. (61 mg./l. — 80 mg./l.), ce qui montre une légère hyperphosphorémie chez ces veaux carencés ;

Calcium : 106,70 mg./l. (95 mg./l. — 108 mg./l.). Une légère hypocalcémie se manifeste. Nous remarquons que ces variations de taux sont de faible intensité. Le taux des phosphatases varie de 2 à 4,5 U.B.

C. — EFFET D'UNE DOSE UNIQUE DE VITAMINE D SUR LA PHOSPHATASÉMIE.

Une altération sensible de l'état général apparaissant chez nos animaux, nous injectons, le 25 février 1954, à chaque animal, en une seule injection intra-péritonéale : 2.500 U.I. de vitamine D et 400.000 U.I. de vitamine A.

Nous avons continué les dosages après cette intervention et donnons ci-dessous les tableaux de nos observations :

TABLEAU XXV. — 4-3-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	70	119	4,3
N° 2	50	99	7
N° 3	64	98	5,2
N° 4	63	100	4,3
N° 5	71	106	5,7
N° 6	68	103	5

TABLEAU XXVI. — 11-3-1953.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	64	140	7,3
N° 2	67	113	6,7
N° 3	71	109	6,7
N° 4	70	117,5	4,1
N° 5	68,5	109	6,4
N° 6	71	106	5,6

TABLEAU XXVII. — 17-3-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	53	111	9,6
N° 2	64	104	7,8
N° 3	67	103	7,5
N° 4	66	111	5,7
N° 5	75	103	4,1
N° 6	62	100	6,7

TABLEAU XXVIII. — 2-4-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	55	122,5	5
N° 2	67	106	4,1
N° 3	55	108	8,3
N° 4	70	110	4,8
N° 5	60	114	3,9
N° 6	55	101	3,9

TABLEAU XXIX. — 7-4-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	59	111	6
N° 2	56	110	4,6
N° 3	60	108	5,7
N° 4	62	112,5	3,4
N° 5	66	109	7,1
N° 6	49	100	5,3

TABLEAU XXX. — 28-4-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	62	97	7,6
N° 2	62	106	5
N° 3	60	100	6,4
N° 4	63	98	4,6
N° 5	60	102	8,4
N° 6	57	96	5,2

TABLEAU XXXI. — 5-5-1954.

Veaux	P. mg./l.	Ca. mg./l.	Phosphatases-U.B.
N° 1	56	104	6
N° 2	57	103	5,5
N° 3	55	107	8,3
N° 4	53	112	6,6
N° 5	55	102	7,7
N° 6	52	104	4,2

Après ces dosages, les résultats moyens sont les suivants :

Phosphore : 61,2 mg./l.

Calcium : 106,9 mg./l.

Phosphatases : 4,1 à 8,2 U.B.

Nous constatons donc une hypophosphorémie et une hypocalcémie légères. Le taux des phosphatases a augmenté par rapport aux dosages précédents. Nous allons maintenant discuter et commenter ces résultats.

D. — DISCUSSION DES RÉSULTATS DES DIFFÉRENTS DOSAGES. EFFET DE L'AVITAMINOSE D SUR LA PHOSPHATASÉMIE.

1) Dans les tableaux I à VI inclus, sont consignés les résultats des dosages effectués à partir du sang d'animaux sains. Rappelons succinctement les taux obtenus : P : 64,4 mg./l., Ca : 112,8 mg./l., phosphatases : 4 à 11,6 U.B. ; nous sommes en accord avec les chiffres avancés par Liegeois et Derivaux.

Les résultats des tableaux VII, VIII et XX sont sub-normaux, quoique obtenus à partir d'animaux carencés. Remarquons que ces veaux sont en début d'expérience et que l'avitaminose D n'a pu encore se manifester. Par contre dans les tableaux IX à XVIII et XXI à XXIV, on enregistre une chute des taux, surtout sensible pour les phosphatases, qui de 4-11,6 U.B., passent à 2-4,5 U.B.

Après l'injection de vitamines A et D le 25 février 1954, les tableaux XXV à XXXI, montrent que le taux de phosphatases est presque redevenu normal, en passant cette fois de 2-4,5 U.B., à 4,1-8,2 U.B.

Le tableau XIX témoigne de résultats qui semblent paradoxaux, concernant le deuxième lot de veaux, carencés en 1954. Nous aurions dû enregistrer des taux normaux de phosphatases ; or nous obtenons une variation qui va de 0,9 U.B., à 3,30 U.B. Ces animaux venaient de voyager et brutalement sevrés, ont manifesté une inappétence quasi totale pendant 48 heures. Ne pourrait-on attribuer

à ce brusque changement de régime et à la fatigue du voyage cette hypophosphatasémie ?

Un veau d'expérience est mort dans la semaine du 28 avril au 5 mai 1953. Son état général était mauvais et il présentait depuis une quinzaine de jours un état diarrhéique persistant. Ses congénères d'ailleurs souffraient eux aussi, du régime et des conditions de vie imposés.

2) *Effets de l'avitaminose sur l'état général :*

Après cette expérimentation pendant 3 mois, deux années consécutives, nous avons constaté que ces veaux placés dans des conditions irrationnelles, carencés en vitamine D et soustraits à l'exposition solaire, présentaient assez vite des troubles de l'état général. Satisfaisant en début d'expérience, il devint de plus en plus mauvais au fil des jours. Les veaux avaient beaucoup perdu de leur vivacité et restaient de longues heures en position décubitale. Les yeux retirés dans les orbites, la tête pendante, ils ne réagissaient que faiblement, lors des prises de sang, contrairement à ce qui se passe en pareil cas avec des animaux de cet âge.

Une diarrhée bulleuse s'est installée quelques semaines après le début de l'expérience, due en grande partie il est vrai à l'aliment composé qui leur était fourni. Cet état s'améliora d'ailleurs lorsque les animaux eurent pris l'habitude de consommer leur litière (paille de seigle), en guise d'aliment de lest, ce qui favorisa l'absorption intestinale.

A ces troubles de l'état général, se rattachent et s'ajoutent des troubles cutané-phanériens. La peau devint sèche, épaisse, abondamment squameuse. Le poil devint terne, cassant, s'arrachant facilement ; de larges zones calvées apparurent. Sur trois de nos veaux, nous avons constaté sur la nuque, les oreilles et les faces latérales de l'encolure, l'apparition de plaques teigneuses. Soignées à l'alcool iodé au 1/4, il fut difficile de les faire disparaître, la peau ne réagissant qu'imparfaitement.

Les sabots ont présenté à la longue une corne sèche, striée, signant une croissance irrégulière.

3) *Effet sur la calcémie :*

Nos dosages montrent que dans l'avitaminose D du veau, la calcémie subit une légère baisse (tableaux IX à XVIII et XXI à XXIV). Le taux moyen est en effet passé de 114 mg./l. à 106,70 mg./l.

4) *Effet sur la phosphorémie :*

Une hyperphosphorémie est constatée chez nos sujets carencés. Cet accident disparaît assez rapidement après l'administration de vitamine D (tableaux XXV à XXXI).

5) *Effet sur la phosphatasémie :*

Nous avons constaté que le taux des phosphatases diminuait d'autant plus, que l'avitaminose progressait. Nous sommes là en contradiction avec Mayeux qui obtint des résultats inverses, lors d'expériences semblables réalisées chez le chien.

La constatation d'écarts, relativement aux taux en Ca et P réputés normaux, sont en général peu propres à fonder un diagnostic précis.

Nous ne pouvons qu'affirmer l'abaissement régulier du taux des phosphatases parallèlement à une aggravation de l'état général en cours d'expérimentation.

CONCLUSIONS

I. — Nombreux sont, chez les jeunes veaux, les états de carence, de pré-carence en vitamine D.

Le diagnostic de ces pré-carences étant impossible avec les éléments cliniques dont on dispose habituellement, la recherche d'un test précoce et spécifique avait son importance.

La constatation d'un taux de phosphatase alcaline sérique compris entre 4 et 12 Unités Bodansky chez le veau sain, son abaissement régulier au cours de la carence expérimentale en vitamine D, et son relèvement après administration de cette dernière, constitue un paradoxe si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus chez d'autres animaux domestiques.

II. — Quand la phosphatasémie s'abaisse en dessous de 4 Unités Bodansky, nous estimons qu'il y a, chez le veau, pré-avitaminose.

III. — Confirmant de nombreux travaux concernant la vitamine D, nous avons constaté que son action bénéfique, s'installe rapidement, avec des effets durables.

IV. — De multiples thérapeutiques, parfois même empiriques, concernant la pré-avitaminose D, ont été utilisées avec des fortunes apparemment diverses. Le résultat de nos expériences semble plaider, dans ce cas, pour une thérapeutique par la vitamine D.

**Vu : LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,**

A. BRION.

**Vu : LE DIRECTEUR
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
JUNG.**

**Vu :
LE DOYEN
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,
A.-H. HERMANN.**

**Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
PROFESSEUR MOURIQUAND.
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,**

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 5 Mars 1955.

**LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.**

BIBLIOGRAPHIE

- BRION (A.). — La Vitamine D3 *Encyclopédie Vétérinaire Périodique*, 1949, 440.
- D'ALLEMAGNE (M.-J.). — Données récentes sur la nature et le métabolisme de l'os, *Actualités Biochimiques*, 1945, n° 2, Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris.
- DREVON (M.-B.) et M^{lle} MANDON. — Dosage rapide de la calcémie, *Lyon Pharmaceutique*, 1953, n° 8.
- FABRE (A.). — Les phosphatases, intérêt de leur dosage, *Presse Médicale*, 1950, n° 41, 743.
- LÉVY (M.), SAPIR (M.) et collaborateurs. — Des critères de l'action de la Vitamine D. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **XXIX**, 1007.
- LÉVY (M.), SAPIR (M.) et MIGNON (S.). — Doses massives de vitamine D2 chez l'adulte humain : reflet humoral, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **XXXI**, 300.
- LIÉGEOIS (F.). — Pathologie médicale des animaux domestiques 1949, 3^e édition, Jules Duculot, éditeur, Gembloux (Belgique).
- LOMER (P.-E.). — Contribution à l'étude de l'hypocalcémie dans la fièvre vitulaire, *Thèse vétérinaire*, Paris, 1935.
- MAYEUX (G.). — Sur l'avitaminose D du chien. Diagnostic chimique. Contrôle du traitement. *Thèse vétérinaire*, Lyon, 1953.
- MEUNIER (P.) et RAOUL (Y.). — Le diagnostic chimique des avitaminoses, Paris, 1942, Masson et C^{ie}, éditeurs.
- MOURIQUAND (G.) et LEULIER (A.). — Les Vitamines antirachitiques, *Traité de physiologie normale et pathologique* publié sous la direction de G.-H. Roger et L. Binet, **XII**, 363 et suivantes.
- OSTERTAG et RINK. — *C. R. Ac. Sc.*, 1950, 1304 et 1305.
- RAAFLAUB (S.). — *Hoppe-Seyler's z. Physiol. Chem. Dtsch.*, 1951, **288**, 228-236.
- RANDOIN (L.) et FOURNIER (P.). — Le dosage des vitamines D antirachitiques par les méthodes biologiques, *Ann. Nut. et Alim.*, 1950, **IV**, n° 2.
- ROCHE (J.) et BOUCHILLOUX (S.). — Spécialité de la phosphatase alcaline, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **XXII**, 739.
- ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). — Les phosphatases, *Exp. An. de Biol. Méd. publiées par M. Polonowski*, 1944, **IV**, 219.
- ROCHE (J.). — La phosphatase des os, *Exp. An. de Biol. Méd. publiées par M. Polonowski*, 1942, **III**, 251.
- SCHWARZENBACH et ACKERMANN. — *Helv. Chim. Acta*, 1947, **30**, 1798 ; *Helv. Chim. Acta*, 1948 ; **31**, 1029.
- STANDSTECT (H.) et SJOBERG (K.). — *Veterinärtidskrift Uppsala*, 1943, 641. Abst. in *Encyclopédie Vétérinaire Périodique*, 1947, n° 3-4.

TABLE DES MATIERES

Introduction	7
<i>Chapitre premier.</i> — L'os	9
La vitamine D — Tests d'avitaminose	18
Avitaminose D expérimentale	21
<i>Chapitre II.</i> — Méthodes de dosage utilisées	23
Dosage du calcium	23
Dosage du phosphore minéral et des phosphatases sanguines	27
<i>Chapitre III.</i> — Résultats des dosages	33
Conclusions	45
Bibliographie	47

